

for IDS (B)

1/1 PLUSPAT - (C) QUESTEL-ORBIT

PN - JP8176212 A 19960709 [JP08176212]

TI - (A) METHOD OF SURFACE-MODIFYING MAGNETIC PARTICLE

PA - (A) JAPAN SYNTHETIC RUBBER CO LTD

PA0 - (A) JAPAN SYNTHETIC RUBBER CO LTD

IN - (A) KASAI KIYOSHI; HAN YOSHIKIMI; KITAJIMA MASAOKI; HIRAHARU

AKIO

AP - JP33560894 19941221 [\*\*\*1994JP-0335608\*\*\*]

PR - JP33560894 19941221 [1994JP-0335608]

STG - (A) Doc. Laid open to publ. Inspec.

AB - PURPOSE: To produce a surface-modified magnetic particles useful as a support for a diagnostic agent, a support for separating bacteria or cells, a support for separating and purifying a nucleic acid or a protein, a support for drug delivery, a magnetic toner or the like.

- CONSTITUTION: 100 pts.wt. dry powder of magnetic polymer particles containing 1-80wt.% magnetic substance is allowed to absorb 2-200 pts.wt. hydrophobic polymerizable monomer, and the mixture is dispersed in water and subjected to a polymerization reaction in the presence of an oil-soluble polymerization initiator.

- COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-176212

(43) 公開日 平成8年(1996)7月9日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 F 2/44	MCQ			
2/18	MBD			
C 0 9 C 1/24	PAN			
3/10	PBW			
G 0 1 N 33/545		A		

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-335608

(22) 出願日 平成6年(1994)12月21日

(71) 出願人 000004178

日本合成ゴム株式会社

東京都中央区築地2丁目11番24号

(72) 発明者 笠井 澄

東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合成ゴム株式会社内

(72) 発明者 范 可君

東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合成ゴム株式会社内

(72) 発明者 北島 政明

東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合成ゴム株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁性粒子の表面改質方法

(57) 【要約】

【目的】 診断薬担体、細菌あるいは細胞分離担体、核酸あるいは蛋白分離精製担体、ドラッグデリバリー担体、磁性トナー等として有用な表面改質された磁性粒子の製造方法を提供する。

【構成】 磁性体を1～80重量%含有する磁性ポリマ一粒子の乾燥粉体100重量部に疎水性重合モノマー2～200重量部を吸収させ、ついで水中に分散させた後、油溶性重合開始剤を用いて重合することを特徴とする磁性粒子の表面改質方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 磁性体を 1～80 重量%含有する磁性ポリマー粒子の乾燥粉体 100 重量部に疎水性重合モノマー 2～200 重量部を吸収させ、ついで水中に分散させた後、油性重合開始剤を用いて重合することを特徴とする磁性粒子の表面改質方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、診断薬担体、細菌あるいは細胞分離担体、核酸あるいは蛋白分離精製担体、ドラッグデリバリー担体、磁性トナー等として有用な表面改質された磁性粒子の製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 磁性ポリマー粒子は磁力により容易に吸着される特徴により、診断薬担体、細胞、蛋白あるいは核酸の分離精製担体等において、優れた取り扱い性が得られると期待されている。これまで知られている磁性粒子の代表的な合成法を挙げるとつぎの様なものがある。まず、ポリマー粒子の内部に磁性体が存在するタイプとしては、特開昭 59-221302 では親油化処理した磁性体を重合性モノマーに分散し、これを懸濁重合する方法が開示されている。特公平 4-3088 では同じく親油化処理した磁性体を重合性モノマーに分散し、モホジナイザーで水中に均質化して重合することにより比較的小粒径の磁性粒子を得ている。特公平 5-10808 では、特定の官能基を有する多孔ポリマー粒子の存在下に鉄化合物を析出させ酸化することで粒子内部に磁性体が入り、大粒径かつ均一径の磁性ポリマー粒子が合成されることが示されている。一方、粒子表面に磁性体が存在するタイプとしては特開平 3-115862 あるいは特開平 5-138009 にてポリマー粒子エマルジョンのなかで鉄化合物を析出させてポリマー粒子の表面をフェライト化する方法が開示されている。

【0003】 これら従来の磁性粒子を診断薬担体等に用いると、磁性体が内部にあるタイプあるいは表面に存在するタイプによらず、多くの場合、感度が大幅に低下したり、非特異酵素反応を示して良好な実用性能が得られない。これは磁性粒子の表面に磁性体が部分的に露出し、あるいは表面と内部の磁性体の間にミクロパスが形成されているため、鉄成分が外部に溶出して実用性能に悪影響をしているものと考えられている。特開平 2-286729 では磁性体粒子をコアとして疎水性架橋モノマーを水中で重合して磁性体を内包した磁性粒子を開示しているが、これでも十分ではない。また、特公平 5-16164 では磁性粒子の表面に非磁性のポリマー層を形成させた構造が開示されているが、その具体的な方法は界面重縮合法とスプレードライ噴霧法のみしか示されておらず適用範囲が限られている。このため、これまでの磁性粒子の使用は鉄成分の溶出のため、これが問題な

い分野に限定的に使用されている状況である。磁性粒子の使用拡大のためには磁性体が完全に内包されている粒子の合成が求められていた。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、従来の磁性粒子に対しても有効に作用する表面処理法の開発を目指して鋭意検討を重ねた結果、表面を完全に被覆する表面改質方法を完成させた。これにより、従来の磁性粒子に対してもこの表面改質法を用いると鉄成分の溶出のない磁性粒子が得られ、磁性粒子の実用性を大幅に高めることが可能になった。すなわち、本発明は磁性体を 1～80 重量%含有する磁性ポリマー粒子の乾燥粉体 100 重量部に疎水性重合モノマー 2～200 重量部を吸収させ、ついで水中に分散させた後、油性重合開始剤を用いて重合することにより得られる表面改質された磁性粒子を提供する。

【0005】 本発明の表面改質された磁性粒子のための基になる磁性ポリマー粒子としては粒子径 0.05  $\mu\text{m}$  ～100  $\mu\text{m}$ 、好ましくは 0.1  $\mu\text{m}$  ～15  $\mu\text{m}$  である。磁性ポリマー粒子中の磁性体には特に制限はないが、酸化鉄系磁性体が好適に使用できる。磁性体の粒子径は小さいほど粒子内部に分散しやすい点から好ましく、磁性体粒子径 20 nm 以下の超常磁性磁性体が特に好ましい。また、本発明の磁性ポリマー粒子のポリマー成分としては、後記する疎水性重合モノマーから選ばれる少なくとも一種のモノマーの（共）重合体であり、好ましくは芳香族ビニル化合物、（メタ）アクリル酸エステル、不飽和カルボン酸などのからなるモノマーの（共）重合体である。本発明で適用できる磁性ポリマー粒子の合成法には特に制限はなく、親油化処理した磁性体を重合性モノマーに分散し、これを懸濁重合する方法、親油化処理した磁性体を重合性モノマーに分散し、ホモジナイザーで水中に均質化して重合する方法、官能基を有する多孔性ポリマー粒子の存在下に鉄化合物を析出させ酸化する方法、ポリマー粒子エマルジョンの中で鉄化合物を析出させる方法など、前記従来の技術例示した合成法で合成された磁性ポリマー粒子が好適に使用できる。本発明で適用できる磁性ポリマー粒子に含有する磁性体の量は 1～80 重量%、好ましくは 5～70 重量%、さらに好ましくは 10～60 重量%である。磁性体の量が 1 重量%より少ないと磁気性能が不足して磁性ポリマー粒子としての目的を果たさない。また、磁性体含量が 80 重量%を越えると磁性体が多すぎポリマー粒子としての機能がなくなり本発明の磁性粒子の素材として適さない。

【0006】 本発明の表面改質を行うには、乾燥した磁性ポリマー粒子の粉体に対して処理を行う。これまで粒子を粉体状態でモノマー吸収処理し重合すると粒子が融着してしまうことが常識とされており、これを避けるために水分分散体の磁性粒子に対してこれにシード重合を行

なうことが通常であった。シード重合では粒子の表面被覆の効率が悪く、またその適用範囲が狭いとの問題があった。しかし、驚くべきことに、本発明の方法を用いると、粉体の磁性ポリマー粒子であっても表面処理を緻密にかつ強固に行うことが可能になってその効果が大幅に向上した。本発明での乾燥した磁性ポリマー粒子の乾燥度は厳密なものでなくともよく、水分含有量 5 重量%程度以下であればよい。磁性ポリマー粒子は粒子表面の疎水化処理をあらかじめ行っておくことが好ましい。疎水化処理としてはシランカップリング剤あるいはチタンカップリング剤が好ましく、これらを水または溶剤に溶解して磁性ポリマー粒子に添加して疎水化処理すればよい。疎水化処理により本発明の粒子表面改質をさらに強固に行うことが出来る。

【0007】本発明において乾燥した磁性ポリマー粒子に吸収させる疎水性重合モノマーとしては 20℃での水への溶解度が 1 重量%以下のビニル系ラジカル疎水性重合モノマーである。使用する疎水性重合モノマーは 1 種または多種混合して使用できる。疎水性重合モノマー中では 20℃での水への溶解度が 1 重量%より大きいモノマーが存在してもよいが、その量は疎水性重合モノマーの 30 重量%以内であり、かつ、水への溶解度の重量加重平均が 1 重量%を越えないことが必要である。ここで水への溶解度が 1 重量%を越えると磁性ポリマー粒子への表面改質が不十分となり本発明の効果が得られない。

【0008】本発明で使用できる疎水性重合モノマーの具体的例を挙げると、スチレン、ビニルトルエン、 $\alpha$ -メチルスチレン、ジビニルベンゼンなどの芳香族ビニル化合物、(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸 2-ヒドロキシエチル、(メタ)アクリル酸 t-ブチル、(メタ)アクリル酸 n-ヘキシル、(メタ)アクリル酸シクロヘキシル、(メタ)アクリル酸 2-エチルヘキシル、(メタ)アクリル酸ラウリル、(メタ)アクリル酸ステアリル、(メタ)アクリル酸ベンジル、(ポリ)エチレングリコールのモノあるいはジ(メタ)アクリレート、(ポリ)プロピレングリコールのモノあるいはジ(メタ)アクリレート、1,4-ブタンジオールのモノあるいはジ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパンのモノ、ジ(メタ)アクリレート、トリ(メタ)アクリレートなどの不飽和カルボン酸エステル類、ジアリルフタレート、ジアリルアクリルアミド、トリアリル(イソ)シアヌレート、トリアリルトリメリテートなどのアリル化合物；(ポリ)エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、(ポリ)プロピレングリコールジ(メタ)アクリレートなどの(ポリ)オキシアルキレングリコールジ(メタ)アクリレートなどが挙げられる。また、アクリル酸、メタアクリル酸、イタコン酸、フマル酸、グリシジルメタアクリレート、ビニルピリジン、ジエチルアミノエチルアクリレート、N-メチルメタアクリルアミド、アクリロニトリルなどの官能基含有モノマーが

挙げられ、好ましいモノマーとしてはスチレン、ジビニルベンゼン、(メタ)アクリル酸などが挙げられる。

【0009】本発明において磁性ポリマー粒子粉体に疎水性重合モノマーを吸収させるには、該疎水性重合モノマーを直接磁性ポリマー粒子粉体に添加し混合することができるが、好ましくは疎水性重合モノマーを有機溶剤に溶解して添加し、磁性ポリマー粒子とよく混合後、有機溶剤を蒸発乾燥させることが好ましい。ここで使用する有機溶剤は低沸点でかつ磁性ポリマー粒子のポリマーを溶解しないものである必要がある。具体的にはアセトン、メタノール、イソプロピルアルコール、エチルエーテル、トルエンなどが挙げられ、使用するモノマーおよび磁性ポリマー粒子のポリマー組成に応じて選定する。なお、このとき疎水性重合モノマーあるいは有機溶剤に油性重合開始剤を添加しておくことができ、各粒子を均一に重合させるために好ましい。本発明において、有機溶剤としては磁性ポリマー粒子粉体と疎水性重合モノマーとの混合物がペースト状から流動化する程度の粘度になる量を加えることが好ましい。具体的には、磁性ポリマー粒子粉体 100 重量部に対して疎水性重合モノマーと有機溶剤の合計が 200~300 重量部となる程度である。本発明で磁性ポリマー粒子に添加する疎水性重合モノマーの量は磁性ポリマー粒子 100 重量部に対し 2~200 重量部、好ましくは 10~150 重量部、さらに好ましくは 30~100 重量部である。2 重量部より少ないと本発明の効果が得られず、200 重量部を越えると粒子表面以外での疎水性重合モノマーの重合の比率が増え磁性粒子を含まない粒子の生成が過多となる。

【0010】本発明で疎水性重合モノマーを吸収した磁性ポリマー粒子を水中には再分散させるために超音波分散機あるいは高剪断速度の分散機を使用することが好ましい。超音波分散機の形式には特に制限はなく、ホーン型あるいはプレート型の発振子をつけたもの、あるいは発振部に液を流通させる連続式のものをを用いることができる。高剪断速度の分散機としてはホモミキサー、コロイドミル、ジェットホモジナイザー、高圧ホモジナイザーなどが挙げられ、これらはいずれも好適に使用できる。しかし、試料液にかかる剪断速度が低いと処理効果がなく、本発明では 2000  $\text{sec}^{-1}$  以上、好ましくは 5000  $\text{sec}^{-1}$  以上の剪断速度が必要である。本発明において超音波分散機を使わない、あるいは 2000  $\text{sec}^{-1}$  より低い剪断速度での分散機で粒子を水中に再分散すると、見かけ上は再分散したように見える場合もあるが、複数の粒子が互いに凝集付着した状態であり水中に単一粒子として分散しない。このため、これを重合すると融着した粒子しか得られない。粒子を分散する水中にはあらかじめ界面活性剤あるいは分散剤を添加することができ、アニオン系界面活性剤、ノニオン界面活性剤、水溶性高分子が使用される。このうち特にノニオン

界面活性剤あるいはノニオンアニオン型界面活性剤が好適に使用できる。

【0011】本発明で疎水性重合モノマーを吸収し水中に再分散した磁性ポリマー粒子を重合するには、油性重合開始剤を用いる。水溶性の重合開始剤を用いると磁性ポリマー粒子の表面での重合でなく、磁性粒子を含まない疎水性重合モノマーのみが重合した新粒子が多量に生じて本発明の目的を達しなくなる。本発明での油性重合開始剤としては、ベンゾイルペルオキシド、ラウロイルペルオキシド、アゾビスイソブチロニトリル等の過酸化化合物、アゾ化合物が挙げられる。油性重合開始剤の使用量は疎水性重合モノマーに対して一般的には0.5～5重量%である。油性重合開始剤の添加方法は、磁性ポリマー粒子に疎水性重合モノマーを吸収させるときに疎水性重合モノマーあるいは有機溶剤とともに添加することが好ましいが、重合の直前に重合組成液に直接あるいは少量のアルコール等に溶解して添加することも可能である。本発明の重合には脱酸素し、無酸素雰囲気下で重合する。重合温度は用いる重合開始剤によって定まるが、例えばベンゾイルペルオキシドを用いる場合は75～85℃で好適に重合できる。

【0012】

【作 用】本発明の表面改質によれば、表面がポリマーで強固に密に被覆された磁性粒子が得られる。このために本発明により得られる被覆された磁性粒子は粒子内部の鉄成分の溶出が全くなく、従来の非磁性のポリマー粒子と同等の粒子の取り扱いができ、性能が得られる。これにより、診断薬として広い範囲の抗原、抗体、蛋白、核酸等を吸着あるいは化学結合させることが可能になった。また、酵素免疫法の診断薬において鉄塩の溶出による非特異発色が抑えられ、診断薬としての実用性が高まった。本発明の方法により表面改質された磁性粒子は表面に磁性体の露出が全くないため、磁性トナーとして有用である。従来、磁性トナーは表面の磁性体の存在のためにトナー使用時の温度湿度によりトナー性能が変化するとの問題があった。本発明の表面改質された磁性粒子はトナーの使用環境条件による性能変化が少ない特徴がある。

【0013】

【実施例】本発明を実施例によってさらに詳しく説明する。本実施例において「%」は「重量%」を「部」は「重量部」を表す。

#### 実施例 1

##### (1) 磁性ポリマー粒子の製造

超常磁性フェライト(平均粒子径10nm)20gを0.005mol/リットルの塩化第二鉄水溶液60g中に分散してフェライト粒子の表面に正の電荷を与えた。次にこの水溶液に濃度10%のオレイン酸ナトリウム水溶液40gを加えて温度30℃で60分間にわたり攪拌を行った。次にこれにスチレン15gおよびジビニルベ

ンゼン5gを加え、希塩酸を用いて混合液をpH6～7に調製した。(スチレンとジビニルベンゼンの水溶解度の加重平均は0.5%)

このとき、フェライトの粒子表面はオレイン酸が吸着されて親油化処理されたものとなり、このフェライトは水相からスチレン相に移動し沈殿するので水相を除去して水洗を充分に行った。次にスチレン相にベンゾイルパーオキシド1gを溶解したスチレン15gを加えて親油化処理されたマグネタイト1gを分散した。次に、このスチレン相をポリビニルアルコール「ゴーセノールGH17」(日本合成化学株式会社製)の2%水溶液200g中に加え、直径5cmのプロペラ型攪拌翼を用いて回転数5000rpmで10分間攪拌を行い、マグネタイトを含有するスチレンの油適を分散してその粒子径を0.1～4μmにした。このようにして得られた懸濁液を容量500ミリリットルのセパラブルフラスコに移し、窒素雰囲気下において回転数120rpmで攪拌しながら濃度80℃で6時間にわたり懸濁重合を行い、磁性ポリマー粒子を得た。この磁性ポリマー粒子の主体粒子径は1.4μm、粒子径分布が0.5～7μm、磁性体含量49%、固形分濃度19%の分散体であった。この粒子をベース磁性粒子(1)とした。

【0014】(2) 上記のベース磁性粒子(1)水分散体を乾燥した粉体10gをアセトン100ミリリットルに分散し、チタンカップリング剤(ブレンアクトKR-TTS)0.2gを加え、アセトンの蒸発後一夜乾燥後させた。乾燥粒子をよくほぐし、モノマーとして、スチレン4g、ジビニルベンゼン0.5g、メチルメタクリレート0.5g、重合開始剤としてベンゾイルペルオキシド0.1g、有機溶剤アセトン10gの混合物を加え、よく混合した後、常温にて解放状態で一夜放置してアセトンを蒸発させるとともに磁性ポリマー粒子にモノマーを吸収させた。

【0015】上記粒子を再度ほぐし、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルの0.5%水溶液1リットルに加え、剪断速度12000cm<sup>-1</sup>であるホモミキサーを用いて10分間の高剪断速度での分散を行った。このとき光学顕微鏡で観察したところ粒子は単一で分散しており、凝集粒子は存在しない状態であった。つぎに、上記分散液の窒素置換した後、80℃で8時間の重合を行った。重合後、重合液には凝集物はなく、ガスクロ分析では残存モノマーはほぼゼロであった。光学顕微鏡及び電子顕微鏡観察では凝集した粒子、融合した粒子は見られなかった。電子顕微鏡での平均粒子径は1.5μm、粒径分布はベース磁性粒子(1)とほぼ同等であった。これを実施例1の磁性粒子とした。

【0016】比較例1～および実施例2および3 粒子分散の際の剪断速度の影響を知るために、実施例1でのホモミキサーでの粒子分散のところを剪断力の異なる分散機、攪拌機をもちいて試作し、比較例1、2、実

実施例 2、3、4とした。なお、実施例 4では槽型超音波分散機（周波数 28 KHz、出力 80 W）で 30 分間処理した。

実験 No	装 置	剪断速度 (sec <sup>-1</sup> )	重合後の粒子の状況
比較例 1	プロペラ攪拌機 (200 RPM)	55	凝集、融着粒子
比較例 2	ホモミキサー (1000 RPM)	1500	凝集粒子が多い
実施例 2	ホモミキサー (1500 RPM)	2200	ほぼ単一粒子
実施例 1	ホモミキサー (10000 RPM)	12000	単一粒子
実施例 3	高圧ホモミキサー (200 気圧)	$1 \times 10^6$	単一粒子
実施例 4	超音波分散機 (80 W, 30 分)	—	単一粒子

#### 【0017】実施例 5

##### (1) 磁性ポリマー粒子の製造

脱イオン水 600 ミリリットル、スチレン 6 ミリリットルおよび平均粒径 0.8  $\mu\text{m}$  以下のフェライトを 8.6 %含有する懸濁液 80 ミリリットルの混合物をシールしたビンへ入れた。ビンを脱気し、55℃のオープン中 1 時間で約 66 rpm で回転した。この混合物へ過硫酸カリウム 12 g と平均粒径 4  $\mu\text{m}$  のポリスチレン粒子を 5 %含有する懸濁液 850 ミリリットルを添加した。ビンを再シールし、脱気し、1 時間回転後、2 %ドデシル硫酸ナトリウム 50 ミリリットルを加えた。さらに 5 時間後、スチレン 6 ミリリットルと過硫酸カリウム 10 g を混合物へ加えた。混合物をさらに 15 時間回転し、ろ過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られる磁性粒子を脱イオン水で 1.6 リットルに再懸濁し、磁性体含有量 11 %、平均粒子型 4.3  $\mu\text{m}$  の磁性ポリマー粒子（これをベース磁性粒子 (2) とする。）を 25 %含有する懸濁液を得た。

(2) 実施例 1 (2) においてベース磁性粒子 (1) の代わりにベース磁性粒子 (2) を用いた以外は実施例 1 (2) と同一の操作を行い、表面改質された磁性粒子を得た。得られた磁性粒子は粒子凝集、粒子融合がなく、平均粒子径 4.3  $\mu\text{m}$  であった。

##### 【0018】比較例 3～5

乾燥させた磁性粒子を使用せずにシード重合法でポリマー被覆すべく試みた。ベース磁性粒子 (1) の水分散体 1 リットル（固形分量 10 g）、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル 1 g を四ツ口フラスコに入れ、モノマーとしてスチレン 5 g を加え 12 時間にわたって攪拌して磁性粒子にモノマーを吸収させた後、窒素置換し、水溶性開始剤として過硫酸カリウム 0.5 g（比較例 3）あるいはベンゾイルペルオキシド 0.5 g（比較例 4）を加えて 80℃で 8 時間の重合を行なった。どちらも重合は完全に行われたが、得られた粒子の電子顕微鏡観察では磁性粒子を含まない新粒子が多量に生成していた。また、比較例 3 において、重合前に粒子にあらかじめモノマーを全量吸収させるのではなく、1/5 量を先に吸収させて重合を開始し、残量を 4 時間にわたって連続的に添加しつつ重合を行なった。これを比較例 5 とし

理した。

剪断速度 (sec<sup>-1</sup>) 重合後の粒子の状況

た。比較例 5 でも比較例 3 と同じく磁性粒子を含まない新粒子が多量に生成した。

##### 【0019】実施例 6～9 および比較例 6～7

磁性粒子 100 部に対して吸収させるスチレン/ジビニルベンゼン/メチルメタクリレート=8/1/1（重量比）からなる疎水性重合モノマーの量を 1（比較例 7）、3（実施例 6）、10（実施例 7）、100（実施例 8）、200（実施例 9）、300 部（比較例 7）（モノマー混合物の組成は）とした以外は、実施例 1 と同一の操作を行なった。実施例 6～9 は単一粒子で新粒子の発生が認められなかった。比較例 6 は単一粒子であるが、ポリマー被覆が不十分で後記の診断薬としての評価で実用性能の上で使えないものであった。比較例 7 は吸収させるモノマーが多く、吸収しきれないモノマーが磁性粒子の外で重合して新粒子が多量に発生した。

##### 【0020】試験例

免疫診断薬担体粒子としての評価 (1) 蛋白飽和吸着量の測定

ポリマーで表面改質された磁性粒子を免疫診断薬担体粒子として評価するために、まず磁性粒子の蛋白飽和吸着量を測定した。磁性粒子の水分散体を固形分で各々 5 mg とり、磁性粒子を磁気分離し pH 7.5 のリン酸生理食塩水緩衝液 1 ml に分散することを 2 回繰り返して粒子の洗浄を行なった。次に各粒子に Rabbit IgG 抗体を 10、25、50、100  $\mu\text{g}$  ずつ添加し 37℃で 30 分間ゆるく振盪した。ついで、磁気分離し上澄みを 280 nm での吸光度測定して残存 IgG をはかり、磁性粒子に吸着した IgG の量を求めた。結果を表 1 に示す。実施例 1～9 で得られた磁性粒子はきれいな飽和吸着曲線をしめしたが、比較例 1～7 で得られた磁性粒子、ベース磁性粒子 (1)、(2) は一定の吸着量を示さず、診断薬の担体粒子としては問題があった。

##### 【0021】免疫診断薬担体粒子としての評価 (2)

酵素免疫法の担体としての評価

磁性ポリマー粒子の水分散体を固形分で各々 10 mg 取り、磁性粒子を磁気分離で分離し pH 7.5 のリン酸生理食塩水緩衝液 1 ml に分散した。ついで 200  $\mu\text{g}$  の抗ヒト IgM 抗体を加え室温で 1 時間ゆるく振盪して磁性粒子に抗体を吸着させ感作操作をした。感作後、磁石で磁性粒子を分離し、上澄みを 280 nm での吸光度測

定して吸着されない残存抗体量を測定したところ、いずれも残存抗体がなくすべての抗体が吸着していた。次に磁気分離した磁性粒子に 0.5% の牛血清アルブミンと 0.1% のポリエチレングリコールを含む pH 7.5 のリン酸生理食塩水緩衝液溶液 1 ml を加え、バイブレーターでよく分散し、室温で 30 分間ゆるく振盪して残りの粒子表面をアルブミンでブロッッキング処理して酵素免疫法 (EIA 法) の診断薬粒子を調整した。

【0022】ヒト IgM 抗原を 0, 50, 100, 500 ng/ml を含むリン酸生理食塩水緩衝液をそれぞれ 100  $\mu$ l 調整し、前記の抗ヒト IgM 抗体感作粒子を含む分散液 20  $\mu$ l を加えて室温で 30 分間静置した。続いて磁気分離した粒子にアセチルコリンエステラーゼを結合した抗ヒト IgM 抗体 100  $\mu$ g を含む溶液 200  $\mu$ l ずつ添加しバイブレータで振動分散させ、25℃

で 1 時間静置した。つぎに、アセチルコリンエステラーゼの基質である Ellman's 試薬 (Cayman 社製) を 100  $\mu$ l 加え、室温で 10 分間ゆるく振盪して酵素反応発色させ、反応停止液である 2 N 硫酸を 50  $\mu$ l 加えてから、412 nm の吸光度を測定した。なお、コントロールとして感作していない粒子にも同様な操作をした。結果を表 2 に示す。実施例の磁性粒子は、抗ヒト IgM 抗体で感作しない未感作状態では発色がほとんどなく、かつ感作すると抗原量にほぼ比例した酵素発色が生じて良好な酵素免疫法の診断薬粒子であった。これに対し、ベース磁性粒子および比較例 1~7 の磁性粒子は未感作状態での酵素発色が高く、非特異発色性が著しいため診断薬としては使えない粒子であった。

【0023】

【表 1】

試料 No	IgG の吸着量 ( $\mu$ g/mg 粒子)			
	IgG の添加量 ( $\mu$ g)			
	10	25	50	100
実施例 1	9.2	24.4	36.8	36.7
実施例 2	9.3	25.6	37.5	38.2
実施例 3	9.0	23.8	35.5	35.9
実施例 4	9.4	23.1	37.8	39.0
実施例 5	9.2	24.5	37.2	37.3
実施例 6	9.0	23.7	35.8	34.5
実施例 7	9.7	24.8	33.8	34.7
実施例 8	9.2	23.7	36.4	37.3
実施例 9	9.7	24.5	35.9	36.4
比較例 1	9.2	20.4	43.8	74.7
比較例 2	9.2	23.4	36.8	66.9
比較例 3	9.0	23.8	40.8	78.2
比較例 4	9.2	24.5	42.8	66.7
比較例 5	9.2	24.2	36.8	86.7
比較例 6	9.2	24.4	47.8	94.7
比較例 7	9.2	24.4	47.8	62.7
ベース磁性粒子(1)	9.7	24.3	50.2	95.2
ベース磁性粒子(2)	9.5	24.9	48.9	96.7

【0024】

【表 2】

試料No.	吸光度値(412nm) 感作粒子 添加したヒトIgM抗原				未感作粒子 (ng)
	0	50	100	500	
実施例 1	0.002	0.072	0.114	0.524	0.004
実施例 2	0.004	0.074	0.120	0.518	0.003
実施例 3	0.003	0.081	0.142	0.594	0.001
実施例 4	0.005	0.069	0.138	0.563	0.004
実施例 5	0.004	0.074	0.128	0.539	0.003
実施例 6	0.010	0.082	0.137	0.572	0.012
実施例 7	0.007	0.082	0.139	0.559	0.010
実施例 8	0.002	0.078	0.116	0.519	0.002
実施例 9	0.003	0.066	0.109	0.438	0.005
比較例 1	0.429	0.484	0.528	0.738	0.438
比較例 2	0.274	0.328	0.368	0.679	0.283
比較例 3	0.476	0.528	0.587	0.753	0.462
比較例 4	0.563	0.598	0.663	0.783	0.538
比較例 5	0.327	0.383	0.411	0.674	0.332
比較例 6	0.329	0.396	0.431	0.623	0.338
比較例 7	0.053	0.072	0.083	0.078	0.065
へ-磁性粒子(1)	0.745	0.756	0.749	0.750	0.756
へ-磁性粒子(2)	0.849	0.832	0.844	0.814	0.894

【0025】

【発明の効果】本発明の方法により表面改質された磁性粒子は、磁性ポリマー粒子の表面に完全にポリマーを被覆し、強固な緻密な被覆層を有する。これにより、本発明の方法により表面改質された磁性粒子は吸着性能が良

好な診断薬担体、細菌あるいは細胞分離担体、核酸あるいは蛋白分離精製担体として好適に使用できる。また、副作用の少ないドラッグデリバリー担体としてあるいは、耐環境性の優れた磁性トナーとして有用である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// G 0 1 N 33/553

(72) 発明者 平春 晃男

東京都中央区築地 2 丁目 11 番 24 号 日本合 40  
成ゴム株式会社内